



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby  
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

## MOLEKULÁRNÍ METODY V EKOLOGII MIKROORGANISMŮ (EKO/MMEM)

### *IZOLACE DNA Z PŘÍRODNÍCH VZORKŮ*

Cílem izolace nukleových kyselin (NK) je rozdělení komplexu DNA-protein a extrakce čisté, nerozštěpené DNA bez příměsí (RNA, bílkoviny). Prvním krokem je vždy *lýza buněk*, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. U živočišných buněk stačí obvykle rozpuštění biomembrán a denaturace proteinu detergentem (obvykle Triton X-100 a laurylsíran sodný). U houbových či rostlinných buněk s buněčnou stěnou musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. protřepáváním na vortexu se skleněnými kuličkami, drcením tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce apod. Pro lýzu pevných tkání nebo pro zvýšení čistoty izolované DNA se někdy k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA.

Buněčný obsah včetně nukleových kyselin se z lyzovaných buněk uvolní do pufovaného roztoku, který kromě detergentů obsahuje etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Ta chelatuje ionty vápníku, které jsou potřebné jako kofaktor nukleáz. Nukleázy bez vápníku nepracují, takže vycytáním vápníku zabráníme rozstípaní čerstvě uvolněné DNA nukleázami, které se z lyzovaných buněk také uvolní. Jako inhibitor nukleáz fungují také některé detergenty, které se používají při lýze buněk - zejména laurylsíran sodný a N-laurylsarkosin. Dalším krokem je pak precipitace DNA etanolem a její následné promytí. Nakonec se DNA rozpustí ve vodě nebo vhodném pufru.

Pro izolaci NK je k dispozici pestrá škála metod. Ke třem nejpoužívanějším metodám (které se od sebe liší použitým druhem rozpouštědla) patří fenol-chloroformová extrakce, metoda adsorpce na pevný podklad (organická rozpouštědla) a vysolování (precipitace proteinu pomocí NaCl).



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby  
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

## Metody izolace DNA:

### Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin

Tradiční fenol-chloroformová metoda extrakce ponechává NK rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní chloroformovou. Protřepáváním dochází k mísení fází, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, takže po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze. Po protřepání je roztok odstředěn pro dokonalé oddělení fází. Na rozhraní mezi fázemi se obvykle objeví bílý prstenec sražených proteinů (tzv. interfáze). Horní vodná fáze obsahuje NK a je přenesena do nové čisté zkumavky. Pro dokonalé odstranění proteinů je nutno extrakci opakovat opětovným přidáním směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol a protřepáváním tak dlouho, dokud se na rozhraní nepřestane po odstředění objevovat bílá proteinová sraženina. U izolace z rostlin, hub a některých bakterií je někdy nutné odstranit i polysacharidy extrakcí s cetyltrimetylamonium bromidem (CTAB). Nakonec je nutné extrahovat ještě jednou směsí jen chloroformu s izoamylalkoholem (24:1), aby byly odstraněny i stopy fenolu v roztoku, které by mohly interferovat např. s použitím enzymů při dalším zpracování izolovaných NK. Z přečištěného vodného roztoku je možné NK vysrážet přidáním koncentrovaného etanolu, po odstředění se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment (peleta). S nukleovými kyselinami se srážejí i soli, které zvyšují účinnost srážení NK a dávají peletě bílé zbarvení. Soli je pak potřeba odmyt 70% etanolem. Čisté NK je možné po odsátí supernatantu rozpustit ve vodě nebo ve vhodném pufru. Protože více než 95% objemu NK v buňce tvoří RNA, převažuje RNA i v tomto roztoku. Pokud potřebujeme pracovat s čistou DNA, musí být RNA odstraněna působením RNázy. Roztok musí být poté znovu přečištěn fenol-chloroformovou extrakcí a DNA sražena etanolem.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby  
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

Tato metoda je používána obvykle pro práci s větším množstvím DNA nebo v některých speciálních postupech.

### **Vysolovací metoda**

Metoda vysolování obchází použití organických rozpouštědel popsaných v předchozí metodě. Tato metoda se používá především k izolaci leukocytární DNA z krve, proto je třeba se nejprve zbavit bezjaderných erytrocytů. Nejprve se proto lyzují membrány erytrocytů amonium-chloridovým pufrům. Dochází k selektivní hemolýze erytrocytu resorpcí  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Leukocytární DNA se izoluje pomocí rozpuštění buněčné membrány enzymem proteinázou K, která má vyšší aktivitu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Následně se přidá  $\text{NaCl}$  v pufru, kterým se lyzují jaderné membrány a vysolením zbývajících proteinů a proteinázy K vzniká bílý precipitát. K supernatantu se přidá 96% etanol a po odstředění se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment, tzv. peleta, která se omyje 70% etanolem a nechá se oschnout. Nakonec se rozpustí v TE pufru nebo ve vodě.

### **Adsorpce na silikát**

Adsorpční metody využívají schopnost NK adsorbovat se na povrchy z oxidu křemičitého (silikát) v přítomnosti chaotropní soli (jodid sodný nebo ionty guanidinu). K roztoku, obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic. Síla vazby závisí na NK, na iontové síle a pH roztoku. Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak elegantně odstranit – částice necháme usadit nebo usazení urychlíme odstředěním, odsajeme roztok nad částicemi a propláchneme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovném odstředění a odsátí roztoku zůstává na částicích adherovaná čistá DNA. Tu lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné

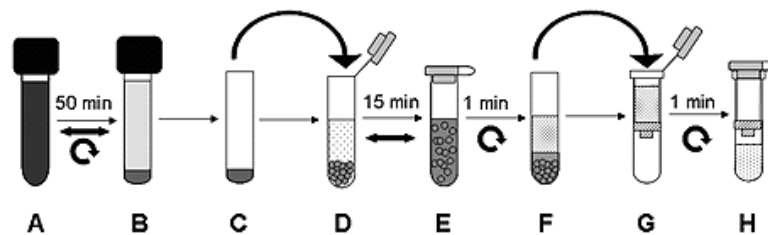
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

částice, nad nimi je čistý roztok DNA. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu s vysokými výtěžky, využívá ji většina komerčních kitů.

Kity jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Pohodlnost použití kitů je dále zvýšena tím, že obvykle používají nástavce do mikrozkušavek, obsahující jemný filtr, který zadrží silikátové částice. Zpracování pak probíhá tak, že jsou roztoky promývány přes kolonku (filtr se zachycenými částicemi, Obr. 1). Namísto tradičního silikátu kity často využívají speciální pryskyřice a mají různě upravené složení pufrů tak, že např. preferují při adsorpci molekuly DNA určitého velikostního rozpětí.



Obr. 1 Schéma izolace DNA pomocí komerčního kitu

(A) vzorek obsahující DNA, (B) centrifugace vzorku, (C) odsání přebytečné vody, (D) přenesení pelet do zkumavky s lyzačním roztokem a skleněnými rozbíjecími kuličkami, (E) protřepání vzorku na vortexu, (F) centrifugace vzorku, (G) přenesení supernatantu na čistou kolonku, (H) na kolonce selektivně zachycena uvolněná DNA, promyta od zbytků proteinů a poté pomocí roztoku se specifickým pH odmyta do sběrné zkumavky



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby  
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

### POSTUP: Izolace DNA pomocí extrakčních kitů

#### Izolace DNA pomocí PowerWater™ DNA Isolation Kit – voda, různé typy biofilmu (kameny, kořeny, makrofyta)

Před započítím práce zahřejte roztok PW1 na 55°C po dobu 5-10 min. Použijte roztok PW1 dokud je stále teplý.

Zkontrolujte roztok PW3, pokud je třeba, rovněž zahřejte na 55°C po dobu 5-10 min. Roztok PW3 může být použit také ještě teplý.

- \* Nafiltrujte vzorek vody na membránový filtr (typ GSWP, porozita 0,22 um, Millipore). Filtrované množství závisí na charakteru vzorku (turbidita, zbarvení atd.). Většinou se filtruje alespoň 1 L vody (u našich vzorků cca 1,5 – 2 L).
  - \* Rozmrzte vzorky různých typů biofilmu (kameny, kořeny ripariální vegetace nebo vodní makrofyta). Vzorky vložte do zkumavek s 10 – 15 ml fyziologického roztoku (objem upravte dle charakteru vzorku - vzorek by měl být v roztoku ponořen, ale snažíme se o použití minimálního množství fyziologického roztoku, aby výsledný supernatant nebyl příliš naředěn). Takto připravené vzorky sonikujte 6 x 30 s (Sonopuls HD 2200, 15 % power) a poté nafiltrujte na membránový filtr (typ GSWP, porozita 0,22 um, Millipore).
- S použitím dvou pinzet odstraňte filtr z filtrační aparatury a srolujte filtrovanou stranou dovnitř.
- Takto srolovaný filtr vložte do 5 ml rozbíjecí zkumavky (Power Water Bead Tube)
- Do zkumavky přidejte **1 ml** roztoku **PW1** (předem zahřátý).

*Pozn.: vzorky, jež obsahují organizmy, u nichž je lýze buněk obtížná (řasy, houby, archea), je možno zařadit zahřátí vzorku s PW1 na 65°C po dobu 10 min*
- Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně do vortex adaptéru a vortexujte maximální rychlostí 10 min.
- Centrifugujte v centrifuze pro 15 ml zkumavky (*Rotofix*) 3 min při maximální rychlosti (6 000 rpm  $\approx$  3 000 x g).
- Pomocí pipety přeneste veškerý supernatant do čisté 2 ml mikrozkušavky (Collection Tube). Očekávejte cca 600-650  $\mu$ l supernatantu.

*Pozn.: Špičku pipety zanořte až na dno přímo do rozbíjecích kuliček a nasajte maximální množství supernatantu. Postup opakujte, dokud neodsajete veškerý supernatant. S velkou pravděpodobností přenesete do Collection Tube i určitou část rozbíjecích kuliček, což ale nemá žádný vliv na následující kroky.*



evropský  
sociální  
fond v ČR



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

8. Centrifugujte v centrifuze *Minispin* 1 min při rychlosti 13 000 x g (13 000 rpm  $\approx$  13 000 x g).
9. Kromě peletky přeneste veškerý supernatant do čisté 2 ml mikrozkušavky.
10. Přidejte **200  $\mu$ l** roztoku **PW2** a krátce vortexujte k promíchání. Poté inkubujte při 4°C po dobu 5 min (použijte vodní lázeň s ledem).
11. Centrifugujte 1 min při rychlosti 13 000x g.
12. Kromě peletky přeneste veškerý supernatant do čisté 2 ml mikrozkušavky.
13. Přidejte **650  $\mu$ l** roztoku **PW3** a krátce vortexujte k promíchání (Roztok PW3 může být použit ještě teplý).
14. Přeneste 650  $\mu$ l supernatantu do kolonky (Spin Filter) a centrifugujte 1 min při rychlosti 13 000 x g. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a opakujte, dokud nepoužijete veškerý supernatant.  
*Pozn. je nutné, aby byly na kolonku nafiltrovány alespoň 2 dávky (většinou je nutno vzorek rozdělit na 3 dávky).*
15. Přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozkušavky.
16. Protřepejte roztoku PW4 před použitím. Přidejte **650  $\mu$ l** roztoku **PW4** a centrifugujte 1 min při rychlosti 13 000 x g.
17. Vylijte přefiltrovanou kapalinu, přidejte **650  $\mu$ l** roztoku **PW5** a centrifugujte 1 min při rychlosti 13 000 x g.
18. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a centrifugujte znovu 2 min při rychlosti 13 000 x g.
19. Přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozkušavky.
20. Přidejte **100  $\mu$ l** roztoku **PW6** doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky.
21. Centrifugujte 1 min při rychlosti 13 000 x g, vyjměte zkumavku z centrifugy a nechejte ještě 2 min stát při laboratorní teplotě.
22. Vyjměte kolonku. DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

Získanou DNA skladujte při teplotě -20°C.

### **Izolace DNA pomocí PowerSoil™ DNA Isolation Kit - sediment**

1. Rozmrazte vzorky sedimentu (15 ml zkumavky) a centrifugujte v centrifuze (*Rotofix*) 3 min při maximální rychlosti (6 000 rpm  $\approx$  3 000 x g).
2. Odlijte vodnou fázi vzorku.
3. Do rozbíjecí zkumavky (PowerBead Tube) navažte 0,25-0,5 g sedimentu.
4. Zkontrolujte roztoku C1, jestliže obsahuje sraženiny, zahřejte na 5 min na 50-60°C.



evropský  
sociální  
fond v ČR



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

5. Do rozbíjecí zkumavky přidejte **60 µl** roztoku **C1** a několikrát převraťte tubu v ruce nebo krátce vortexujte.
6. Umístěte rozbíjecí zkumavky vodorovně do vortex adaptéru a vortexujte maximální rychlostí 15 min.
7. Centrifugujte v centrifuze *Minispin 30* s při rychlosti 10 000 x g (10 000 rpm  $\approx$  10 000 x g).
8. Přeneste supernatant do čisté 2 ml mikrozukavky (Collection Tube). Očekávejte cca 400-500 µl supernatantu.
9. Přidejte **250 µl** roztoku **C2** a vortexujte 5 s. Poté inkubujte při 4°C po dobu 5 min (použijte vodní lázeň s ledem).
10. Centrifugujte 1 min při rychlosti 10 000 x g.
11. Kromě peletky přeneste do čisté 2 ml mikrozukavky maximálně 600 µl supernatantu.
12. Přidejte **200 µl** roztoku **C3** a krátce vortexujte (nebo protřepat v ruce). Poté inkubujte při 4°C po dobu 5 min (použijte vodní lázeň s ledem).
13. Centrifugujte 1 min při rychlosti 10 000 x g.
14. Kromě peletky přeneste do čisté 2 ml mikrozukavky 750 µl supernatantu. V tomto kroku je lépe použít místo pipety prostou dekantaci
15. Přidejte **1200 µl** roztoku **C4** a vortexujte 5 s (obrátit v ruce).
16. Přeneste 675 µl supernatantu do kolonky (Spin Filter) a centrifugujte 1 min při rychlosti 10 000 x g. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a opakujte, dokud nepoužijete veškerý supernatant.  
*Pozn. vzorek je nutno rozdělit na 3 dávky.*
17. Přidejte **500 µl** roztoku **C5** a centrifugujte 30 s při rychlosti 10 000 x g.
18. Vylijte přefiltrovanou kapalinu a centrifugujte znovu 1 min při rychlosti 10 000 x g.
19. Přeneste kolonku do čisté 2 ml mikrozukavky.
20. Přidejte **100 µl** roztoku **C6** doprostřed bílé membrány uvnitř kolonky.
21. Centrifugujte 30 s při rychlosti 10 000 x g, vyjměte z centrifugy a nechejte ještě 2 min stát při laboratorní teplotě.
22. Vyjměte kolonku. DNA je nyní připravena pro různé aplikace.

Získanou DNA skladujte při teplotě -20°C.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

„Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby  
životního prostředí“

CZ.1.07/2.2.00/28.0032

### Potřebný materiál:

pracovní rukavice  
stojan na 2 ml mikrozskumavky  
soustavy komerčních kitů  
centrifugační zkumavky 15 ml, 2 ml  
pipeta 20-200  $\mu$ l + špičky  
pipeta 200-1000  $\mu$ l + špičky  
stopky, pinzeta

### Chemikálie:

roztoky komerčních kitů

### Doporučená literatura:

- Power Water and Power Soil DNA Isolation Kit – Instruction Manual (MoBio Laboratories)
- Sborník textů: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Kolektiv autorů, 2008. Ústav dědičných metabolických poruch VFN Praha.
- <http://biologie.upol.cz/metody/>
- <http://kmil.trios.cz/Predchozi/kmil07053c.htm>